Aus dem Hygiene-Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H. KLIEWE)

Die Beeinflussung der Phosphatasen von M. pyogenes var. aureus durch Penicillin und Neomycin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Marianne Ruda

aus Kattowitz/Oberschlesien

Mainz ~~1957~~

1960

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH, Wiesbaden

Dekan: Prof. Dr. H. Lossen

Referent: Prof. Dr. Dr. G. Gillissen

Koreferent: Prof. Dr. H. Kliewe

Datum des Diploms -3. FEB. 1960

Gewidmet meinen Eltern

Sonderdruck aus
Zeitschrift für Hygiene, Bd. 144, Heft 5, S. 401—406 (1958)
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg

Aus dem Hygiene-Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H. Kliewe)

Die Beeinflussung der Phosphatasen von M. pyogenes var. aureus durch Penicillin und Neomycin

Von

M. Ruda

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. November 1957)

Nach den Untersuchungen von Dufrenoy u. Pratt sowie von Pratt hemmen kleine Penicillin (Pc)-Konzentrationen im Gegensatz zu hohen die alkalische Phosphatase von M. pyogenes var. aureus. Die Bestimmungen erfolgten qualitativ. Wir untersuchten deswegen quantitativ den Einfluß von Pc und von Neomycin, die bezüglich der Kollateralsensibilität verschiedenen Gruppen zugehören (Szybalski, Bryson), bezüglich der Art der Resistenzbildung („multistep-pattern“) aber gleichartig sind (Demerec; Hsi u. Bryson), in bakteriostatischen und subbakteriostatischen Konzentrationen auf die Aktivität der sauren und der alkalischen Phosphatase von einem Pc-sensiblen und von einem Pc-resistenten Stamm von Staph. aureus.

Material und Methoden

Als Testkeime dienten Staph. aureus Sg. 511 (Se) mit einer im Reihenverdünnungstest festgestellten mittleren Sensibilität von 0,04 E Pc/ml und 1,8 μg Neomycinsulfat/ml sowie ein Staph. aureus-Stamm (Re) mit einer solchen von 1250 E Pc/ml und 7,5 μg Neomycin/ml. Beide Stämme wurden auf Schrägagar aufbewahrt.

Statt Phosphatpuffer — Phosphationen sollen die Phosphatasen hemmen (Roche) — wurden verwandt: Na-Acetat-Eisessig-Puffer von p_H 5,6, Veronalpuffer nach Michaelis von p_H 9,7 und Glykokollpuffer von p_H 10,6 sowie von p_H 12,0 für die Entwicklung der Farbe bei Verwendung der Substrate Colamin-Phenolphthaleinphosphat (CPP) mit einem Molekulargewicht von 722,64 resp. p-Nitrophenyl-Dinatriumphosphat (NPP) mit einem Molekulargewicht von 262,66.

Die Eichkurven wurden mit Phenolphthalein bzw. mit p-Nitrophenol angelegt. Verwandt wurde das Photometer Eppendorf, Cuvetten mit einer Tiefe von 20 mm sowie die Filter mit 546 nm bei den Versuchen mit CPP und mit 405 nm für die Versuche mit NPP. Die für die Versuche erforderlichen Lösungen waren stets 0,004 m (CPP) und 0,01523 m (NPP). Vor den Versuchen wurde immer die Stabilität, d.h. die Nichtverseifung der CPP-Lösungen kontrolliert (s. Gillissen u. Ruda). Bei allen Versuchen diente ein Puffer/Substrat-Gemisch als Kontrolle zum Ausschluß einer spontanen Hydrolyse.

R. UNIV.

Für die Versuche wurden Keime aus jungen, 16 Std alten Kulturen verwandt, da die Phosphataseaktivität mit zunehmendem Kulturalter abnimmt (Barnes u. Morris). Dazu wurden Agarplatten mit Keimsuspensionen der Stämme beimpft, nach 16 Std 37° C mit Aqua dest. (p_H 7,0) abgeschwemmt und einmal gewaschen (Kühlzentrifuge, 30 min, $\sim 500 \times g$), das Keimsediment mit Bouillon ohne Zuckerzusatz aufgenommen, die Keimkonzentration als das Mittel aus 3 mikroskopischen Zählungen unter Berücksichtigung der Clone (Besprechung der Methode und der Fehlerbreite s. Gillissen u. Ruda) bestimmt und durch Verdünnung mit Bouillon die für die einzelnen Versuche erforderliche Keimkonzentration eingestellt. Während der Keimzählung wurde die Keimsuspension in Eiswasser aufbewahrt.

Zur Untersuchung der sauren Phosphatase war der Ansatz für Se: 34,0 ml Bouillon ohne Zuckerzusatz + 1,0 ml Antibioticalösung (3,0 E Pc/ml resp. 200 μg Neomycin/ml) + 15,0 ml Keimsuspension mit 10^9 Keimen/ml. Der Ansatz für Re lautete: 30,0 ml Bouillon + 5 ml Antibioticalösung (40000 E Pc/ml resp. 200 μg Neomycin je Milliliter) + 15,0 ml Keimsuspension mit 10^9 Keimen je Milliliter. Damit lagen die Antibiotica-Endkonzentrationen im Ansatz über der mittleren Hemmkonzentration. Bei den Kontrollen wurde statt der Antibioticalösung 1,0 ml resp. 5 ml Aqua dest. oder 1,0 ml resp. 5,0 ml einer Lösung mit durch Hitze inaktiviertem Pc derselben Ausgangskonzentration zugegeben.

Zur Untersuchung des Einflusses von subbakteriostatischen Antibioticakonzentrationen wurden diese Versuche bei gleichen Volumenverhältnissen, jedoch mit Endkonzentrationen im Gesamtansatz von 0,02 E Pc/ml resp. 1,25 μg Neomycin/ml (für Se) und von 1200 E Pc/ml resp. 5 μg Neomycin/ml (für Re) durchgeführt.

Zur Untersuchung der alkalischen Phosphatase, die in geringerer Aktivität vorhanden ist als die saure, wurden mehr Keime benötigt. Die Ansätze waren deswegen: 136,0 ml Bouillon + 4,0 ml Antibioticalösung (subbakteriostatische Antibiotica-Endkonzentrationen für Se 0,02 E Pc/ml resp. 1,25 μg Neomycin/ml und für Re 1200 E Pc/ml resp. 5 μg Neomycin/ml; — bei überbakteriostatischen Endkonzentrationen für Se 0,06 E Pc pro Milliliter resp. 4 μg Neomycin/ml und für Re 4000 E Pc/ml resp. 20 μg Neomycin/ml) + 60,0 ml Keimsuspension mit $15 \cdot 10^9$ Keimen je Milliliter. Auch bei diesen Versuchen dienten als Kontrollen Ansätze mit den gleichen Volumina Aqua dest. sowie mit wäßrigen Lösungen von durch Hitze inaktiviertem Pc statt der Antibioticalösungen.

Die genannten Reaktionsgemische wurden 90 min im Wasserbad bei 37° C bebrütet. Die Keime wurden dann mit Aqua dest. gewaschen (Kühlzentrifuge, 40 min, $\sim 500 \times g$), mit Aqua dest. eingestellt auf p_H 5,6 (bei nachfolgender Untersuchung der sauren Phosphatase) resp. auf p_H 9,7 (bei nachfolgender Untersuchung der Aktivität der alkalischen Phosphatase) aufgenommen, die Keimkonzentration durch mikroskopische Zählung bestimmt und mit Aqua dest. des entsprechenden p_H-Wertes auf $2 \cdot 10^9$ sowie auf $5 \cdot 10^8$ Keime/ml (bei der sauren Phosphatase) und auf 10^{10} Keime/ml sowie auf $5 \cdot 10^9$ Keime/ml (alkalische Phosphatase) eingestellt. Von diesen Keimsuspensionen wurden im Hinblick auf die Volumenänderungen der Keime unter Antibioticaeinfluß nach feuchter Veraschung mit H_2SO_4 unter Zugabe von Selenreaktionsgemisch der Gesamt-N (Kjeldahl) in doppeltem Ansatz bestimmt und der Mittelwert für die weiteren Berechnungen verwandt.

Untersuchung der Phosphataseaktivität. 1,5 ml CPP-Lösung (resp. NPP-Lösung) + 2,5 ml Puffer + 1,0 ml Aqua dest. + 1,0 ml Keimsuspension ($2 \cdot 10^9$ sowie $5 \cdot 10^8$ Keime/ml bei der sauren Phosphatase und 10^{10} sowie $5 \cdot 10^9$ Keime/ml bei der alkalischen Phosphatase). Alle Suspensionen und Lösungen hatten bei der sauren Phosphatase p_H 5,6 und bei der alkalischen Phosphatase p_H 9,7. Nach 30 min 37° C (saure Phosphatase) und 60 min 37° C (alkalische Phosphatase) im Wasserbad wurden 0,1 ml oder 0,5 ml NaOH bis zur deutlichen Rot- bzw.

Gelbfärbung zugegeben, um die Pufferkapazität nicht zu überlasten, und mit Glykokollpuffer (p_H 10,6 bei den Versuchen mit CPP und p_H 12,0 bei den Versuchen mit NPP) bis NaOH + Glykokollpuffer = 4,5 ml ergänzt. Nachträglich erfolgte stets noch eine p_H-Kontrolle (p_H-Meter). Die Farbkonzentration wurde nach Zentrifugieren elektrophotometrisch ermittelt (bei starker Farbkonzentration gegebenenfalls nach vorhergehender Verdünnung) und die mittels der Eichkurven erhaltenen absoluten Werte auf Mikrogramm Phenolphthalein resp. Mikrogramm

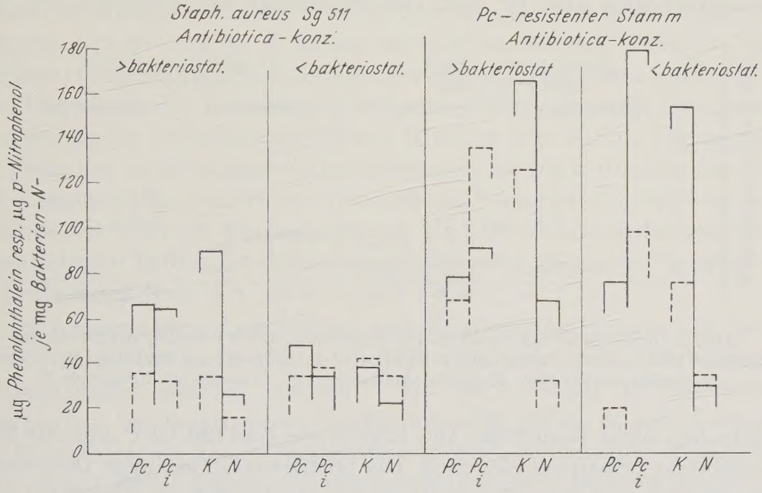

Abb. 1. Die Beeinflussung der sauren Phosphatase durch Penicillin und Neomycin
Versuch mit CPP: ———; Versuch mit p. NPP: — — —; Versuch mit Penicillin: *Pc;* Versuch mit inaktivem Pc: *Pci.;* Kontrolle (Aqua. dest.): *K;* Versuch mit Neomycin: *N*

p-Nitrophenol je Milligramm Bakterien-N umgerechnet. Danach wurden die Versuche also aus versuchstechnischen Gründen nach Keimkonzentrationen angesetzt, die Ergebnisse aber auf die erst später zur Verfügung stehenden N-Werte bezogen.

Resultate

Aus Abb. 1 ist zu entnehmen, daß die Aktivität der sauren Phosphatase des sensiblen Stammes durch überbakteriostatische Pc-Konzentrationen (Vergleich mit inaktiviertem Pc oder mit der Aqua dest.-Kontrolle) sowohl mit CPP als auch mit NPP als Substrat nicht beeinflußt wird. Dagegen bewirkt Neomycin unter Verwendung beider Substrate eine deutliche Senkung der Aktivität der sauren Phosphatase. Bei subbakteriostatischen Antibiotica-Konzentrationen und CPP als Substrat scheint Pc eine — an sich denkbare — geringe Steigerung der Phosphataseaktivität zu bewirken, was jedoch im Hinblick auf das mit NPP erzielte Resultat in den Fehlerbereich fallen dürfte. Neomycin bewirkt jedoch mit beiden Substraten auch in dieser geringen Konzentration eine kleine Minderung der Fermentaktivität.

Im Gegensatz dazu wird aber die saure Phosphatase des resistenten Stammes (Abb. 1) sowohl von über- als auch von subbakteriostatischen Konzentrationen von Pc und von Neomycin bei allen Versuchen deutlich gehemmt.

Die alkalische Phosphatase (Abb. 2) des sensiblen und des resistenten Stammes wird sowohl mit über- als auch mit subbakteriostatischen Konzentrationen von Pc und von Neomycin bei Vergleich mit den

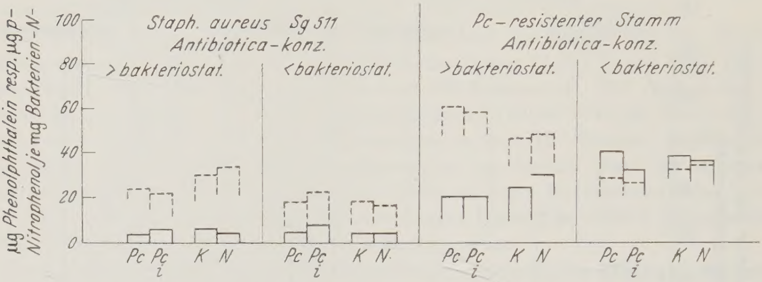

Abb. 2. Die Beeinflussung der alkalischen Phosphatase durch Penicillin und Neomycin Versuch mit CPP: ——; Versuch mit p. NPP: — — —; Versuch mit Penicillin: *Pc*; Versuch mit inaktivem Pc: *Pci*; Kontrolle (Apua. dest.): *K*; Versuch mit Neomycin: *N*

Kontrollen nicht beeinflußt. Die Ergebnisse sind mit CPP und mit NPP als Substrat prinzipiell identisch. Die beobachteten geringen Differenzen zwischen Versuch und Kontrolle sind so klein, daß sie deutlich in die Fehlerbreite fallen.

Diskussion

Die Fehlermöglichkeiten, die aus einem unterschiedlichen Kulturalter oder aus Differenzen in der p_H-Einstellung resultieren können, wurden berücksichtigt.

Ein nicht ganz ausschaltbarer Fehler liegt aber in der Methode der Keimzählung, da alle diese Methoden (mikroskopische Zählung, Nephelometrie, Lebend-Keimzahl-Bestimmung im Plattengußverfahren) eine erhebliche Fehlerbreite haben, die lediglich dadurch verkleinert werden kann, daß durch mehrere gleiche Bestimmungen ein Mittelwert erzielt wird, der dem wahren Wert möglichst nahe kommt. Wir haben bei der hier angewandten und sorgsam durchgeführten mikroskopischen Zählung mit einer im Verhältnis tragbaren Streuung von etwa ± 12% zu rechnen (siehe Gillissen u. Ruda). Da die bei den Versuchen mit dem resistenten Stamm und der sauren Phosphatase erhaltenen Differenzen weit über diesen Prozentsatz hinausgehen und die Resultate mit einer 2. Methode reproduzierbar waren, dürfte ein Zufallsbefund ausgeschlossen sein.

Good nimmt an, daß die Resistenz bedingt sei durch eine verminderte Permeabilität der Zellmembran für den Hemmstoff, verursacht

durch eine spontane oder experimentelle Änderung des p_H-Gradienten. Bei den hier beschriebenen Versuchen wurden intakte Zellen, also keine Lysate oder Extrakt, benutzt. Es wäre gegebenenfalls denkbar, daß durch die Antibiotica eine Hemmung der Phosphatase infolge einer Diffusionshemmung der Phosphatase vorgetäuscht wird. Nach der Annahme von Good dürfte Pc — besonders bei den Versuchen mit subbakteriostatischen Pc-Konzentrationen — nicht oder ungenügend in die Zellen eindringen. Um so eher ist deswegen die hier beobachtete deutliche Verminderung der sauren Phosphataseaktivität des resistenten Stammes als eine Hemmung des Ferments aufzufassen. Sollte aber eine Permeabilitätsstörung der Zellmembran für den Hemmer oder für die Phosphatase als Folge der Antibioticaeinwirkung zustande kommen, dann müßte auch mit dem sensiblen Stamm bei Verwendung bakteriostatischer oder subbakteriostatischer Pc-Konzentrationen eine Wirkung auf die unter den beschriebenen Bedingungen gemessene saure oder alkalische Phosphatase zu beobachten sein.

Die hier gemachte Feststellung, daß die alkalische Phosphatase durch Pc und durch Neomycin nicht beeinflußt wird, widerspricht teilweise den Beobachtungen anderer Autoren[3,7]. Da die Aktivität der alkalischen Phosphatase bei Staph. aureus verhältnismäßig gering ist und deswegen zur Demonstration dieser Phosphatase größere Keimzahlen erforderlich sind, ist es wahrscheinlich, daß die anders lautenden Beobachtungen, die auf qualitativen Versuchen mit dem Zylindertest auf Agar beruhen, auf eine zu kleine Keimzahl im Hemmhof zurückzuführen sind. Überdies spielt das Optimum des p_H-Wertes, das in einer Agarplatte im Hinblick auf das gewünschte Keimwachstum kaum genau eingehalten werden kann, eine wesentliche Rolle (Barnes u. Morris). Aus diesen Gründen erscheint die Differenz in den Untersuchungsergebnissen mit einer qualitativen und der hier angewandten quantitativen Methodik verständlich.

Zusammenfassung

Untersucht wurde der Einfluß von über- und subbakteriostatischen Konzentrationen von Penicillin und Neomycin auf die Aktivität der sauren und der alkalischen Phosphatase eines sensiblen und eines sehr resistenten Stammes von M. pyogenes var. aureus unter quantitativen Gesichtspunkten sowohl mit Colamin-Phenolphthaleinphosphat als auch mit p-Nitrophenyl-Dinatriumphosphat als Substrat.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wird durch beide Antibiotica weder in über- noch in subbakteriostatischen Konzentrationen unter den Versuchsbedingungen vermindert. Ebenso hat Penicillin auf die saure Phosphatase des sensiblen Stammes keinen Einfluß, während Neomycin in überbakteriostatischen und etwas weniger in subbakterio-

statischen Konzentrationen die saure Phosphatase desselben sensiblen Stammes hemmt. Sehr deutlich ist dagegen die Hemmung der sauren Phosphatase des resistenten Stammes durch Penicillin und Neomycin sowohl in über- als auch in subbakteriostatischen Konzentrationen bei Verwendung von beiden Substraten.

Literatur

[1] BARNES, E. H., and J. F. MORRIS: A quantitative study of the phosphatase activity of micrococcus pyogenes. J. Bact. **73**/1, 100—104 (1957). — [2] DEMEREC, M.: Production of Staph. strains resistant to various concentrations of Penicillin. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. **31**, 16—24 (1945). — [3] DUFRENOY, J., and R. PRATT: Cytochemical mechanisms of Penicillin action. J. Bacter. **56**, 99—105 (1948). — [4] GILLISSEN, G., u. M. RUDA: Die Korrelation zwischen Phosphatasen-Aktivität und Penicillinresistenz bei M. pyogenes var. aureus. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. (im Druck). — [5] GOOD, M. G.: A physico-chemical theory of drug-resistance. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. **161**, 195—198 (1954). — [6] HSI, J., and V. BRYSON: Genetic studies on the developement of resistance to neomycin and dihydrostreptomycin in Mycobacterium ranae. Amer. Rev. Tuberc. **62**, 286—299 (1950). — [7] PRATT, R.: Symposium on the Mode of action of antibiotics. Part. IV. Mechanisms of Penicillin action in vitro. Bact. Rev. **17**/1, 41—49 (1953). — [8] ROCHE, J.: in "The Enzymes", Sumner, J. B., K. Myrbäck ed. Vol. I, Part. 1, Acad. Press. Inc. New York/N. Y. (1950). — [9] SZYBALSKI, W., and V. BRYSON: Genetic studies on microbial crossresistance to toxic agents I- crossresistance — of E. coli to fifteen antibiotics. J. Bact. **64**, 489—499 (1952).

Prof. Dr. Dr. G. GILLISSEN, Hygiene-Institut der Johannes Gutenberg-Univ. Mainz

Lebenslauf

Ich wurde am 15. Februar 1933 in Kattowitz in Oberschlesien geboren. Mein Vater war kaufmännischer Angestellter. 1939 trat ich in Brieg in die Schule ein. 1946 wurden wir aus Oberschlesien ausgewiesen und kamen nach Thüringen, wo ich 1951 meine Reifeprüfung ablegte. Im gleichen Jahre starb mein Vater. 1952 begann ich mit dem Medizinstudium in Greifswald, 1953 kam ich nach Mainz, wo ich seitdem das Studium fortsetze.